

氏 名 (本籍)	藤 田 雅 弘 (群馬県)
学 位 の 種 類	獣医学博士
学 位 記 番 号	乙第 340 号
学位授与の番号	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文の要件	サルにおける <i>Pneumocystis carinii</i> 感染に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 金 内 長 司 (副査) 教授 板 垣 博 教授 藤 谷 英 男

論 文 内 容 の 要 旨

Pneumocystis carinii (Pc) 感染は、自発性 (日和見) 感染症のひとつと考えられ、これまでヒトを始めとしてマウス、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、サル、ウマなどの多くの動物種で報告されており、実験動物では悪い飼育環境のラットに Pc が広く不顕性に感染していて、コーチゾンなどの免疫抑制剤を投与すると顕性化することが知られている。

特に、カリニ肺炎は、Pc によって免疫不全をともなう疾病に併発する重篤な肺炎であり、AIDS 患者ではカリニ肺炎が頻発し、その発症率は欧米で 60~80% に達し、AIDS 患者の死因の第一にあげられている。

一方、サル類については、自然状態における Pc の汚染あるいは感染に関する研究は非常に少なく、また、サル AIDS に併発するカリニ肺炎に関する研究もほとんど報告されていない。

Pc はその形態や抗原虫薬が有効であることなどから原虫類と考えられているが、最近、Pc のリボソーム RNA の塩基配列が調べられ、原虫類よりも真菌類に近いことが報告されている。また、現在 Pc は *in vitro* の培養が困難であり、動物を用いる分離、継代のみが可能である。

そこで、本研究では、(1) 実験室飼育サル (カニクイザル)、野生サル (カニクイザル、ニホンザル) における Pc シスト数および Pc 抗体価の測定による自然感染状況、(2) 実験感染サル AIDS に併発した Pc の感染状況、および (3) サル由来 Pc とラットおよびマウス由来 Pc の性状の差異についてそれぞれ調べ、それらの一部を明かにした。

1. サル類における Pc 感染状況の調査

調査したサルは、実験室飼育の育成カニクイザル 149 頭、野生カニクイザル 51 頭ならびに野生ニホンザル 40 頭であった。

1) 肺における Pc シストの検出

育成カニクイザル 149 頭の肺組織を採取し、ガラスホモジナイザーで PBS 10% 乳剤を作製し、 25μ l をガラススライドに塗抹、乾燥後、Toluidine blue O (TBO) 染色し、顕微鏡下で Pc シスト数を測定した。Pc シストの検出率は雄 28.1%、雌 56.5%、平均 45.6% であった。シスト数は、雄で平均 3.8×10^4 個/g、雄で平均 1.3×10^4 個/g 個、総平均 1.0×10^4 個/g であった。

2) 間接蛍光抗体法 (IFA) による Pc 抗体価の測定

Pc 感染ラット肺を PBS 乳剤とし、集シスト法により Pc シストを回収し抗原とした。このラット由来 Pc シスト浮遊液 $5 \mu\text{l}$ (約 1×10^5 個) をガラススライドに載せて風乾し、一次血清として 2 段希釈の被検サル血清を滴下し、 37°C 、1 時間反応させた。さらに、二次血清として FITC ラベル抗ヒト IgG ウサギ血清を滴下し、 37°C で 1 時間反応させ蛍光顕微鏡下で特異蛍光を観察した。

その結果、育成カニクイザル 149 頭の抗体陽性率は雄 52.6%、雌 72.8%、平均 65.1% であり、平均抗体価は 22.7 倍であった。野生カニクイザル 51 頭の抗体陽性率は雄 100.0%、雌 86.7%、平均 88.2% であり、平均抗体価は 41.6 倍であった。また、野生ニホンザル 40 頭における抗体陽性率は雄 80.0%、雌 85.0%、平均 82.5% であり、平均抗体価は 35.6 倍であった。

これらのことから、調査頭数は必ずしも多くないが、サル類における集シスト法による正確な肺の Pc シスト数ならびに Pc 抗体の保有状況について初めて明らかとなった。また、野生ザルは育成ザルに比較して、Pc 抗体陽性率および平均抗体価のいずれも高い傾向がみられたが、これは野生ザルの生活環境、栄養状態などが育成ザルに比べて悪いことに起因するものと考えられた。

2. 実験感染サル AIDS における Pc の感染状況

1) 実験的 SIV 感染ザルの性状

サル AIDS の発症実験には、中国産アカゲザル雄 5 頭 (No. 1 ~ No. 5、年齢 3 ~ 5 歳、体重 3.3 ~ 6.1 kg) が用いられ、TCID₅₀ 価 1.5×10^4 のサル AIDS ウイルス SIVmac251 が静脈内に接種され、P 3 アイソレーター内の個別ケージで飼育された。

SIV 感染アカゲザル No. 1、No. 2、No. 3 の 3 頭は衰弱が著しいため、それぞれ感染 41 週目、48 週目、94 週目にベントバルビタールで安楽死させた。安楽死時にそれぞれ 22%、36%、20% の体重減少がみられた。No. 4 は 12% の体重減少がみられ 103 週目で死亡した。No. 5 は 120 週間経過しても生存していた。

SIV は接種後 6 週目からすべてのサルの末梢リンパ球から分離され、SIV 接種後 3 週間目から実験終了まですべてのサルから 1,000 倍以上の抗体価で検出された。

すべてのサルでヘルパー T 細胞とサブレッサー T 細胞の比率が低下し、SIV 感染による細胞性免疫機能の低下が強く示唆された。

2) SIV 感染ザルの病理組織学的所見

4 頭のサル (No. 1 ~ No. 4) を剖検し、主要臓器の組織標本 (10% 中性緩衝ホルマリンで固定、HE、PAS、Grocott、TBO 染色) を作製し観察した。

No. 2、No. 3、No. 4 の肺に Pc シストが確認された。No. 3、No. 4 は特徴的な重度のカリニ肺炎を呈し、肺腔は広範囲にわたり PAS 染色で染まる泡沫状物質 (トロフォゾイト、炎症産物) で充満し、拡張していた。Pc は肺胞上皮細胞の表面に集積し、肺胞内の泡沫状物質の中にもみられた。炎症細胞の肺腔への浸潤はほとんどみられないが、肺胞中隔は一見幅が広くみえ、軽度の炎症細胞の浸潤があると思われ、肺胞壁は肥厚していた。いずれのサルにおいても、肺以外の臓器に Pc による病変は見られなかった。

3) SIV 感染ザルの血中 Pc 抗体価の測定

Pc 抗体価は IFA により測定した。抗原としての Pc シストは、SIV 感染アカゲザルの肺から 0.1% コラゲナーゼおよびデタージェント処理で回収した。シスト浮遊液 $5 \mu\text{l}$ (約 1×10^6 個) をマルチウエルガラススライドにのせ、2 段階希釈のサル血清を滴下し、 37°C 、1 時間反応させた後、さらに FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ血清で 37°C 、1 時間反応させた。その結果、SIV 感染による免疫機能の低下にもかかわらず Na 3 および Na 4 でそれぞれ 1 : 40、1 : 80 の抗体価が測定された。

4) SIV 感染ザルにおける Pc の体内分布

PCR 法により各臓器における PcDNA の検出を試みた。使用したプライマーは、Wakefield らによって決定されたラット Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA のラージサブユニットの塩基配列に基づき合成された。PCR の条件は、ディネーター 94°C 90 秒、アニーリング 50°C 90 秒、エクステンション 72°C 120 秒であり、合計 40 サイクル増幅した。その結果、Na 3、Na 4 のサルの肺以外の広範囲の臓器 (気管リンパ節、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、脾臓、心筋、脳、小腸、腸間膜リンパ節、膀胱、精巣、下顎腺、甲状腺) から Pc が検出された。

これらのことから、カリニ肺炎は、サル AIDS でもヒト AIDS の場合と同様に容易に発症すること、また、重度の肺炎を併発したサル AIDS では、Pc は全身の諸臓器に伝搬されていることがわかった。

3. サル、ラットおよびマウス由来 Pc の抗原性ならびに病原性の差異

Pc は一属一種で、同一種がヒトを含めて種々の動物に感染しているものと考えられてきた。しかし、最近では異なる宿主由来の Pc 間に抗原性、病原性に差があることが、マウス、ラット、ヒトならびにフェレット由来 Pc について報告されている。しかし、サル由来 Pc については報告がない。今回、サル由来 Pc とマウスならびにラット由来 Pc の抗原性および病原性の差について調べた。

1) サル、ラットおよびマウス由来 Pc の抗原性の比較

ウェスタンブロッティング法は Waltzer らの方法に従った。抗原としてマウスおよびラット由来 Pc を 200W50 分間超音波処理し、これを 0.2% SDS-0.06M Tris-1% グリセロール-0.5% 2 ME 液で 3 分間煮沸後、9,000xg 20 分間遠心し、その上清を 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。分離した蛋白質を Towbin らのウェスタンブロッティング法によりニトロセルロース膜に転写 (12V 120 分間) した。つぎに、蛋白質を転写した膜を 3% スキムミルクで 2 時間ブロッキングし、一次血清としてのサル血清、抗マウス Pc ウサギ免疫血清、Pc 感染ラット血清ならびに抗ラット Pc ラット免疫血清で反応させ、二次血清としてそれぞれホースラディッシュペルオキシターゼ標識された抗ヒト IgG ヤギ血清、抗ウサギ IgG ヤギ血清および抗ラット IgG ウサギ血清で反応させた。

その結果、抗原と抗体がホモの組合せの場合は、いずれも 116kD と 52kD の 2 本の主要なバンドおよび 82、70、67kD などのバンドが認められた。しかし、ヘテロの組合せの場合には、いずれも 116kD のバンドはほとんど認められなかった。したがって、各動物由来 Pc の分子量 116kD の抗原は、それぞれの Pc に対する抗血清でのみ認識されると考えられ、116kD の蛋白質にそれぞれの Pc に特異的な抗原が存在することが示唆された。

2) サルおよびラット由来 Pc のミトコンドリア遺伝子断片の比較

ラットおよびサルの Pc 感染肺の乳剤を作製し、プロテナーゼ K で消化後、フェノール・クロロホル

ム抽出およびエタノール沈澱法で PcDNA を回収した。PCR のプライマーを加え、ディネーター94℃ 90秒、アニーリング50℃90秒、エクステンション72℃120秒の条件で合計40サイクル増幅した。PCR プロダクトは2%アガロースゲルで泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 下で観察した。

その結果、ラットおよびサル Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA のラージサブユニット領域の遺伝子の一部が増幅された。各 PCR プロダクトのシーケンスをジデオキシシチエンターミネーション法で解析したところ、サルとラットは基本構造は類似しているが、それぞれ異なる領域も存在することが明らかとなり、サル Pc のプロダクトはラット Pc のものより12bp 短い343bp の DNA であった。

3) 免疫不全マウスおよびラットを用いたサル由来 Pc の感染実験

免疫不全動物であるスキッドマウスとヌードラットを用いてアカゲザル由来 Pc の感染実験を試みた。スキッドマウス10匹とヌードマウス5匹に、それぞれ1×10⁴個のシストを経鼻的に接種後、P3アイソレーターで飼育し、ヌードラットには酢酸コーチゾンを毎週1回皮下接種した。それぞれ2ヵ月間、4ヵ月間飼育し、解剖後、肺の Pc シスト数の測定および病理学的検査を実施し Pc 感染の有無を調べた。

その結果、いずれの個体からも Pc は検出されなかったことから、サル由来 Pc は、マウスおよびラットにおいては増殖することができず、宿主特異性があることが示唆された。

以上の結果から、(1)サル Pc は、マウスならびにラット Pc と同様に116kD の蛋白質にサル Pc に特異的な抗原が存在すること、(2)ラット由来 Pc とサル由来 Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列には、それぞれに共通する部分と異なる特異的な部分があること、(3)サル由来 Pc はマウス、ラットに感染しなかったことから、病原性に関して宿主特異性があることが示唆された。

4. 要約

- 1) サル類における肺の Pc シスト数および Pc 抗体の保有状況が明らかにされ、野生ザルは育成ザルよりも Pc 抗体陽性率、抗体価ともに高いものがみられた。
- 2) 実験的サル AIDS においても、ヒト AIDS の場合と同様にカリニ肺炎が容易に発症し、重度の肺炎を併発したサル AIDS では、Pc は全身の諸臓器から検出された。
- 3) ウエスタンブロッティング法によりサル Pc の116kD の蛋白質に、サル Pc に特異的な抗原の存在が示唆された。
- 4) PCR 法によって増幅されたラットおよびサル Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列には、それぞれに共通部分と特異部分が認められた。
- 5) サル由来 Pc は感染実験によりマウス、ラットに感染せず、病原性に関して宿主特異性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Pneumocystis carinii (Pc) はその形態や抗原虫薬が有効であることなどから原虫類と考えられているが、最近、Pc リボソーム RNA の塩基配列が調べられ、真菌類にも近いことが報告されている。また、現在 Pc は *in vitro* の培養が困難であり、動物を用いる分離、継代のみが可能である。

Pc 感染は、自発性（日和見）感染症のひとつと考えられ、これまでヒトを始めとしてマウス、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、サル、ウマなどの多くの動物種で報告されており、実験動物では悪い飼育環境のラットに Pc が広く不顕性に感染していて、コーチゾンなどの免疫抑制剤を投与すると顕性化することが知られている。特に、カリニ肺炎は、Pc によって免疫不全の宿主に発症する重篤な肺炎であり、AIDS 患者では、その発症率は欧米で60～80%に達し、死因の第一にあげられている。

一方、サル類については、自然状態における Pc の汚染あるいは感染に関する研究は非常に少なく、また、サル AIDS に併発するカリニ肺炎に関する研究もほとんど報告されていない。

そこで、著者は、(1)実験室飼育サル（カニクイザル）、野生サル（カニクイザル、ニホンザル）における肺の Pc シスト数および血中 Pc 抗体価の測定による自然感染状況、(2)実験感染サル AIDS における Pc の感染状況、および(3)サル由来 Pc とラットおよびマウス由来 Pc の性状の差異についてそれぞれ調べ、それらの一部を明かにした。

本研究の概要はつぎのとおりである。

1. サル類における Pc 感染状況

調査したサルは、実験室飼育の育成カニクイザル149頭、野生カニクイザル51頭ならびに野生ニホンザル40頭であった。

1) 肺における Pc シストの検出

育成カニクイザル149頭の肺組織の PBS 乳剤塗抹標本を Toluidine blue 0 (TBO) 染色し、Pc シスト数を測定した。Pc シストの検出率は雄28.1%、雌56.5%、平均45.6%であった。シスト数は、雄で平均 3.8×10^4 個/g、雌で平均 1.3×10^4 個/g個、総平均 1.0×10^4 個/gであった。

2) 間接蛍光抗体法 (IFA) による Pc 抗体価の測定

Pc 感染ラット肺より集シスト法によって Pc シストを回収し抗原とし、一次血清として被検サル血清、二次血清として FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ血清をそれぞれ用い、IFA により Pc 抗体を測定した。

その結果、育成カニクイザル149頭の抗体陽性率は雄52.6%、雌72.8%、平均65.1%であり、平均抗体価は22.7倍であった。野生カニクイザル51頭の抗体陽性率は雄100.0%、雌86.7%、平均88.2%であり、平均抗体価は41.6倍であった。また、野生ニホンザル40頭における抗体陽性率は雄80.0%、雌85.0%、平均82.5%であり、平均抗体価は35.6倍であった。

これらのことから、調査頭数は必ずしも多くないが、サル類における集シスト法による肺の Pc シスト数ならびに Pc 抗体の保有状況について初めて明らかにされた。また、野生ザルは育成ザルに比較して、Pc 抗体陽性率および平均抗体価のいずれも高い傾向がみられた。これは野生ザルの生活環境、栄養状態などが育成ザルに比べて悪いことに起因するものと考えられた。

2. 実験感染サル AIDS における Pc の感染状況

1) 実験的 SIV 感染ザルの性状

サル AIDS の発症実験には、中国産アカゲザル雄 5 頭 (No.1～No.5、年齢 3～6 歳、体重 3.3～6.1kg)

が用いられ、TCID₅₀力価 1.5×10^4 のサル AIDS ウイルス SIVmac251が静脈内に接種され、P 3 アイソレーター内の個別ケージで飼育された。

SIV 感染アカゲザル Na 1, Na 2, Na 3 の 3 頭は衰弱が著しいため、それぞれ感染 41 週目、48 週目、94 週目にベントバルビタールで安楽死させた。安楽死時にそれぞれ 22%, 36%, 20% の体重減少がみられた。Na 4 は 12% の体重減少がみられ 103 週目で死亡した。Na 5 は 120 週間経過しても生存していた。

SIV は接種後 6 週目からすべてのサルの末梢リンパ球から分離され、SIV 接種後 3 週間目から実験終了まですべてのサルから 1,000 倍以上の抗体価が検出された。すべてのサルでヘルパー T 細胞とサブレッサー T 細胞の比率が低下し、SIV 感染による細胞性免疫機能の低下が強く示唆された。

2) SIV 感染ザルの病理組織学的所見

4 頭のサル (Na 1 ~ Na 4) の主要臓器の組織標本を作製し観察した。

Na 2, Na 3, Na 4 の肺から Pc シストが検出され、Na 3, Na 4 は特徴的な重度のカリニ肺炎を呈し、肺胞腔は広範囲にわたり PAS 染色で染まる泡沫状物質 (トロフォゾイト、炎症産物) で充満し、拡張していた。Pc は肺胞上皮細胞の表面に集積し、肺胞内の泡沫状物質の中にもみられた。炎症細胞の肺胞腔への浸潤はほとんどみられないが、肺胞中隔は一見幅が広くみえ、軽度の炎症細胞の浸潤があると思われる、肺胞壁は肥厚していた。いずれのサルにおいても、肺以外の臓器に Pc によると思われる病変は見られなかった。

3) SIV 感染ザルの血中 Pc 抗体の測定

Pc 抗体価は IFA により測定した。抗原には、集シスト法によって SIV 感染アカゲザルの肺から回収した Pc シストを用い、一次血清として被検サル血清、二次血清として FITC 標識抗ヒト IgG うさぎ血清をそれぞれ用いた。その結果、SIV 感染による免疫機能の低下にもかかわらず Na 3 および Na 4 でそれぞれ 1 : 40, 1 : 80 の抗体価が測定された。

4) SIV 感染ザルにおける Pc の体内分布

PCR 法により各臓器における PcDNA の検出を試みた。使用したプライマーは、ラット Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA のラージサブユニットの塩基配列に基づき合成された。その結果、Na 3, Na 4 において肺の他に広範囲の臓器 (気管リンパ節、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、心筋、脳、小腸、腸間膜リンパ節、膀胱、精巣、下顎腺、甲状腺) から Pc が検出された。

これらのことから、カリニ肺炎は、サル AIDS でもヒト AIDS の場合と同様に容易に発症すること。また、重度の肺炎を併発したサル AIDS では、Pc は全身の諸臓器に伝播されていることがわかった。

3. サル、ラットおよびマウス由来 Pc の性状

Pc は一属一種で、同一種がヒトを含めて種々の動物に感染しているものと考えられてきた。しかし、最近では異なる宿主由来の Pc 間に抗原性、病原性などに差違があることが、マウス、ラット、ヒトならびにフェレット由来 Pc について報告されている。しかし、サル由来 Pc については報告がない。今回、サル由来 Pc とラットならびにマウス由来 Pc について比較した。

1) サル、ラットおよびマウス由来 Pc の抗原性の比較

サル、ラットおよびマウス由来 Pc シストを超音波処理し、ウェスタンブロッティング法により抗原

分析をおこなった。一次血清としてサル血清、抗マウス Pc ウサギ免疫血清、Pc 感染ラット血清ならびに抗ラット Pc ラット免疫血清を用い、また、二次血清としてホースラディッシュペルオキシターゼ標識の抗ヒト IgG ヤギ血清、抗ウサギ IgG ヤギ血清および抗ラット IgG ウサギ血清を用いた。

その結果、抗原と抗体がホモの組合せの場合は、いずれも116kDと52kDの2本の主要なバンドおよび82, 70, 67kDなどのバンドが認められた。しかし、ヘテロの組合せの場合には、いずれの組合せにおいてもこれらのバンドのうち116kDのバンドのみがほとんど認められなかった。したがって、各動物由来 Pc の分子量116kD の抗原は、それぞれの Pc に対する抗血清でのみ認識されると考えられ、それぞれの Pc に特異的な抗原であることが示唆された。

2) サルおよびラット由来 Pc のミトコンドリア遺伝子断片の比較

サルおよびラットの Pc 感染肺の乳剤からの PcDNA を回収し、2.(4)項のプライマーを用いて PCR 法を行った。

その結果、サルおよびラット Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA のラージサブユニット領域の遺伝子の一部が増幅された。両 PCR プロダクトのシーケンスを解析したところ、基本構造は類似しているが、それぞれ異なる領域も存在すること、また、サル Pc のプロダクトはラット Pc のプロダクトより12bp 短い343bp の DNA であることが明らかとなった。

3) 免疫不全マウスおよびラットにおけるサル由来 Pc の感染性

免疫不全スキッドマウス（10匹）とヌードラット（5匹）に、それぞれアカゲザル由来 Pc シスト 1×10^4 個を経鼻的に接種し、P3 アイソレーターで飼育した。ヌードラットには酢酸コーチゾンを経口投与し、毎週1回皮下接種した。それぞれ2ヵ月間、4ヵ月間の飼育後、肺の Pc シスト数の測定および病理組織学的検査を実施し Pc 感染の有無を調べた。

その結果、いずれの個体からも Pc は検出されなかった。したがって、サル由来 Pc は、マウスおよびラットにおいては増殖することができず、感染性において宿主特異性があることが示唆された。

これらのことから、(1)サル Pc は、マウスならびにラット Pc と同様に116kD の蛋白質にサル Pc に特異的な抗原が存在すること、(2)サル由来 Pc とラット由来 Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列には、それぞれに共通する部分と異なる特異的な部分があること、(3)サル由来 Pc はマウス、ラットに感染せず、感染性において宿主特異性があることが示唆された。

以上の成績を要約するとつぎのとおりである。

- ① サル類における肺の Pc シスト数および血中 Pc 抗体の保有状況が明らかにされ、野生ザルは育成ザルよりも Pc 抗体陽性率、抗体価ともに高いことが認められた。
- ② 実験的サル AIDS においても、ヒト AIDS の場合と同様にカリニ肺炎が容易に発症し、重度のカリニ肺炎では、Pc は全身の諸臓器から検出された。
- ③ ウェスタンブロッック法によりサル Pc の116kD の蛋白質に、サル Pc に特異的な抗原の存在が示唆された。
- ④ PCR 法によって増幅されたラットおよびサル Pc のミトコンドリア・リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列には、それぞれに共通部分と特異部分が認められた。

⑤ サル由来 Pc はマウス，ラットに感染せず，感染性において宿主特異性であることが示唆された。

以上のように，本論文は，これまで比較的研究が遅れていたサル類における Pc の自然感染状況，サル AIDS に併発するカリニ肺炎，さらにサル由来 Pc の性状について，それぞれの一部を明かにしたものである。今後，サル類における Pc の感染，疫学などの解明に寄与するところ大きく，獣医公衆衛生また人畜共通感染症の研究分野で高く評価でき，博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績と認める。